

マウス顎下腺抽出液のリンパ球幼若化反応に対する抑制作用

奈良県立医科大学細菌学教室

羽 室 顕 子

SUPPRESSIVE EFFECT OF MOUSE SUBMANDIBULAR GLAND EXTRACT ON MITOGEN-INDUCED LYMPHOBLASTOGENESIS

AKIKO HAMURO

Department of Bacteriology, Nara Medical University

Received September 30, 1991

Summary: The present study was conducted to identify the presence of the suppressive factor(s) in the submandibular gland of male mouse to the blastogenesis of mitogen-stimulated lymphocytes, and the possible role of testosterone in the induction of this factor. Extract of the mandibular gland (MSG-extract) of male mouse inhibited directly concanavalin A- or lipopolysaccharide-induced blastogenesis of splenic lymphocytes. Furthermore, macrophages which had been stimulated with MSG-extract produced in its culture supernatant a suppressive effect on mitogen-induced lymphoblastogenesis. In contrast, MSG-extract of female mice did not affect the blastogenesis of mitogen-stimulated splenocytes. However, MSG-extract of female mice treated with testosterone exhibited a similar suppressive effect, although testosterone did not exert such effect on lymphocytes at the same concentrations as detectable in MSG-extract of male mice. The suppressive activity of MSG-extract of male submandibular gland was heat-stable and with isoelectric focusing analysis, the isoelectric point of this factor was determined to be 7.4. Thus, the present study has shown that in male submandibular glands there is an immunosuppressive factor as well as immunoenhancing factors including several growth factors, and the production of this factor by the submandibular gland was regulated by testosterone. These results may suggest that the difference in immune responses between males and females is partly attributable to that in the biological activity of submandibular glands between the two sexes.

Index Terms

mouse, submandibular gland, mitogen-induced lymphoblastogenesis, testosterone

緒 言

ラットやマウスの顎下腺は、形態的かつ機能的にも、雌雄における差が著明である。アンドロゲンの標的器官である、顎下腺には、アンドロゲン・レセプターが存在し、ホルモンの刺激によって、種々の酵素や生理的活性物質の産生が亢進する^{1)~5)}。

また、1960年代に Cohen らによって、雄マウス顎下腺

に nerve growth factor (NGF)^{6)~8)} および epidermal growth factor (EGF)^{9)~11)} が存在することが報告されて以来、多くの生理的活生物質が発見され¹²⁾¹³⁾、顎下腺の消化器官としての外分泌作用のみならず、内分泌器官としての役割についても重要視されるようになった。特に雄マウス顎下腺が、免疫学的に様々な、作用を有することが、注目を集めるようになった。1968年に Takeda らは、雄マウス顎下腺抽出液をマウスの腹腔内に投与する

と、胸腺、リンパ組織が萎縮すると報告し¹⁴⁾¹⁵⁾、Kongshavnら(1979)はマウス顎下腺抽出液は、移植片の拒絶反応を抑制することを報告している¹⁶⁾。Hiramatsuら(1979)は顎下腺を摘出されたマウスにおいては、遅延型過敏症が増強され、顎下腺抽出液の投与により、遅延型反応は正常レベルに回復したと報告している¹⁷⁾。しかし、このような免疫応答調節作用の機序や活性物質の本体については、未だ不明な点が多い。本研究では、マイトジェンに対する脾細胞の幼若化反応におよぼすマウス顎下腺抽出液の作用を中心に解析し、顎下腺抽出液の免疫応答調節作用発現と性ホルモンとの関係について考察を加えた。

材料および方法

1. 実験動物

ddY系、雄および雌マウス(7~8週令)は日本SLCより、C3H/HeJ(H-2^k)雌マウス(8~10週令)、Balb/c(H-2^d)雌マウス(8~10週令)はそれぞれ日本クレアより購入し、固形飼料オリエンタルMF(オリエンタル酵母株式会社、東京)、水により飼育した。顎下腺は8週令のマウスから得た。

2. 培養液

脾細胞の培養には、RPMI 1640 medium(日水製薬株式会社、東京)に10%牛胎児血清(Hazalton; USA)、10mM HEPES、3.0mg/ml NaHCO₃、 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol、100U/ml penicillin、100μg/ml streptomycinを添加したものをRPMI 1640 complete mediumとして使用した。腹腔マクロファージの培養にはAlpha Modification of Eagle's Medium; α MEM(Flow Laboratories, Scotland)に10%牛胎児血清、10mM HEPES、3.0mg/ml NaHCO₃、 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol、100U/ml penicillin、100μg/ml streptomycinを添加したものを使用した。

3. 脾細胞の調製

雌マウスの脾臓を摘出し、一對のすりガラス付きラスイドガラスの間で細胞をDulbecco's phosphate buffered saline(Ca²⁺、Mg²⁺不含: PBS(-))中にて分散させた。1,200rpm、10分間の遠心にて集めた脾細胞から、細胞中に混在する赤血球を蒸留水で溶血させた後、直ちに高濃度PBS(-)を加えて等張に戻した。PBS(-)にて洗浄後、10⁶/mlの濃度の脾細胞浮遊液をcomplete mediumにて調整した。これらの細胞の生死はトリパンブルー染色により調べ、生存率95%以上であることを確認した。

4. リンパ球の調整

T-cellは、脾細胞浮遊液から、付着細胞をplastic

adherenceにて除去した後、Juliusらの方法¹⁸⁾に従ってナイロンウールカラムを用いて分離した。溶出してくるフラクションをT-cell richの浮遊液とした。B-cellは、T-cellを溶出した後の、ナイロンウールカラムをシリンジで圧迫して押し出し、抗マウスT-cell血清および補体で処理した後、培養液に浮遊させた。これをB-cell richの浮遊液とした。なお、この方法により、T-cell richの浮遊液では96%以上がThyl positive、SIg negative、B-cell richの浮遊液では96%以上がSIg positiveであることを確認した。

5. リンパ球幼若化反応

96穴平底カルチャープレート(Corning Glass Works, Corning NY)に、種々の濃度に希釈した、サンプルまたは培養液をwellあたり100μlずつ入れ、これに10⁶/mlの濃度に調整した、細胞浮遊液を100μlずつ加えた。マイトジェンとしてConcanavalin A(ConA; type IV, SIGMA Chemical Co. St. Louis, Mo.)を最終濃度2μg/ml、あるいはlipopolysaccharide(LPS; Salmonella typhimurium Westphal type; Difco Laboratory Detroit, Mich)を最終濃度30μg/mlになるように加えた。37℃、5% CO₂ incubator内で72時間培養し、培養終了18時間前に、[³H] thymidine(74mBq/mmol)を37μBqずつ各wellに加えた。Semiautomated cell harvester(Skatron, Norway)にてグラスフィルター上に集め、DNAに取り込まれた[³H]thymidineの量を液体シンチレーションカウンター(Beckman)にて測定した。

6. 混合リンパ球反応(Mixed lymphocyte reaction: MLR)

混合リンパ球反応はPeckらの方法¹⁹⁾に準じて行なった。すなわち、Balb/c雌マウスの脾細胞(10⁷/ml)をmitomycinC(50μg/ml)にて30分間処理した後、PBS(-)にて3回洗浄し、これをstimulator cellとした。Responder cellとして、C3H/HeJ雌マウスの脾細胞を使用した。いずれも10⁶/mlの濃度で培養液中に浮遊させた。平底96穴カルチャープレートに、サンプルまたは培養液をwellあたり100μlずつ入れ、細胞浮遊液をそれぞれ50μlずつ加えて200μlとし5% CO₂、37℃の条件下で96時間培養した。培養終了16時間前に[³H] thymidineを37μBqずつ各wellに加え細胞内DNAに取り込まれた[³H] thymidineの量を測定した。

7. Interleukin 2(IL 2)の調製

IL 2はマウス脾細胞(1×10⁶/ml)をConA(5μg/ml)で24時間刺激して得たcell freeの上清に α メチル-D-マンノピラジド(和光純薬工業株式会社; 大阪)(20 mg/ml)を加えてConAの活性を中和した後、22μm ミリボ

アフィルターで濾過滅菌したものを用いた。

8. IL 2 活性の測定

IL 2 活性は、T-lymphoblast を用いて測定した。T-lymphoblast は脾細胞を ConA (5 μ g/ml) で 48 時間刺激した後、mannoside 含有 PBS(-) でよく洗浄したものを使用した。96 穴平底カルチャープレートに、種々の濃度のサンプルを well あたり 50 μ l ずつ入れ、2 \times 10⁶/ml に調整した、T-lymphoblast 浮遊液を 100 μ l ずつ加えた。これに IL 2 を 50 μ l ずつ加え、5% CO₂, 37℃ で 48 時間培養した。培養終了 8 時間前に 37 μ Bq/well [³H] thymidine を加え、細胞内 DNA に取り込まれた、[³H] thymidine の量を測定した。

9. 腹腔マクロファージ培養上清

腹腔マクロファージは、thioglycollate broth (TGC; Difco) 3ml を雌マウス腹腔内に投与し、3 日後腹腔内渗出性細胞を、1% ヘパリン加 PBS(-) 5ml にて peritoneal lavage を 2 回くり返して回収した。回収した細胞は PBS(-) にてよく洗浄後、1 \times 10⁶/ml の濃度で培養液に浮遊させた。96 穴平底カルチャープレートに細胞浮遊液を 100 μ l ずつ加え、細胞をプレートに十分に接着させた後、medium を交換して非付着細胞を除去した。これに種々の濃度の雄の MSG-extract を 100 μ l ずつ加え、5% CO₂, 37℃ で、48 時間培養した。上清を捨て、37℃ に保温した PBS(-) にて 3 回洗浄後、10% 牛胎児血清含有 α -MEM のみを加え、さらに、24 時間培養し、その上清を採取した。

10. 脾細胞の MSG-extract による前処理

脾細胞を 20% MSG-extract 存在下、ポリスチレンカルチャーチューブ (Corning; Ny) 内で 48 時間培養後、PBS(-) で 2 回洗浄した。トリパンブルー染色にて生細胞数を数えて 1 \times 10⁶/ml に調整し、2 μ g/ml の ConA を加え、96 穴平底カルチャープレートで、さらに 72 時間培養した。

11. MSG-extract の腹腔内投与

In vivo における MSG-extract の脾臓に対する影響を調べるために、雌マウスの腹腔内に MSG-extract, あるいは、コントロールとして RPMI 1640 培地を、1 ml ずつ 3 日間連続投与し、最終投与後、6 日目に、脾臓を摘出し、脾細胞浮遊液を先述の如く調整した。

12. マウスへの性ホルモン投与

雄マウスには 2 mg/ml の濃度でコーンオイルに懸濁した 17- β -エストラジオール (ナカライテスク株式会社; 京都) を、雌マウスには 2 mg/ml の濃度でコーンオイルに懸濁したテストステロン (和光純薬工業株式会社; 大阪) を投与した。いずれも、連続 3 日間 1 日 1 回

0.1 ml ずつ皮下に注射し、最終投与後 6 日目に顎下腺を摘出し、抽出液を作成した。

13. 組織抽出液の調整

MSG-extract および腎抽出液 (Kidney extract) は、雌雄両マウスの顎下腺および腎臓を摘出し、Kemp らの方法²⁰⁾に準じて調製した (Fig. 1)。顎下腺は表層の結合組織を除去した後、蒸留水と PBS(-) にて血液成分を除去した。組織は、湿重量の 5 倍量の PBS(-) を加え、Physcotron (株式会社日音医理科器械製作所) にてホモジネートし、18,000 G, 20 分間、4℃ にて遠心した。上清に飽和硫酸アンモニウム溶液を最終濃度 36% になるように加え、1 時間放置後、18,000 G, 15 分間、4℃ にて遠心した。さらに、その上清に飽和硫酸アンモニウム溶液を最終濃度 64% になるように加え、1 時間放置後、18,000 G, 15 分間、4℃ にて遠心し、沈渣を PBS(-) に fresh tissue 50mg/ml となるように溶解した。これを、PBS(-) および RPMI 1640 培地にて透析し、22 μ m ミリポアフィルターで濾過滅菌し、-20℃ で保存した。

14. MSG-extract のチャコール・デキストランによる吸収処理

雄 MSG-extract に、等量の 0.5% チャコール-TrisEDTA 液 (0.5% チャコール, 0.05% デキストラン含有) を加え、4℃, 3 時間攪拌し、3,000rpm, 10 分間遠

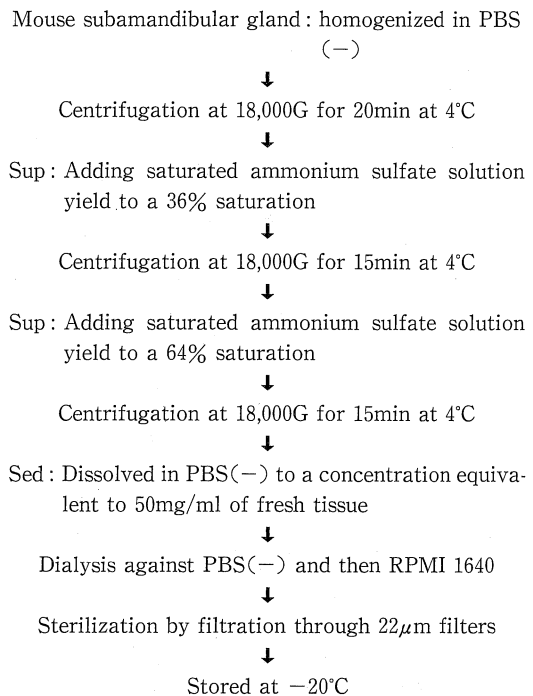


Fig. 1. Preparation for MSG-extract.

心した。上清にさらに等量の0.5%チャコール-
TrisEDTA液を加え、4℃、3時間攪拌し、3,000rpm、
10分間遠心した。上清を採取し、12,000rpm、15分間、
4℃にて遠心した。この上清を限外濾過(Amicon;
Amicon Corp; Danvers, Mass)してもとのサンプルの
濃度に濃縮した。

なお、雄 MSG-extract の熱処理は100℃、30分間行な
った。

15. 等電点電気泳動

等量点電気泳動は調整用液体等電点電気泳動装置ロト
フォア(BIO-RAD; 東京)にて行なった。雄 MSG-
extract 10ml を蒸留水で透析した後、蒸留水を30 ml、
アンフォライトを最終濃度5%になるように加え、12 W
定電力、4時間泳動を行なった。分画したサンプルは、
pHを測定した後、1 M塩化ナトリウム溶液、および
PBS(-)で透析後、22μm ミリポアフィルターで濾過滅菌
した。

16. 蛋白量の測定

サンプル中の蛋白質濃度は、Lowry 法²¹⁾および
Coomassie Brilliant Blue G-250 による色素結合法²²⁾に
て測定した。

結 果

1. MSG-extract 投与雌マウスの脾細胞幼若化反応
雄の MSG-extract 投与マウスの脾細胞では、 $[^3\text{H}]$
thymidine の取り組み量は、ConA 非存在下で $1025 \pm$
 323cpm 、ConA 存在下で $1206 \pm 430\text{cpm}$ であり、幼若化
反応は完全に抑制された。一方、雌 MSG-extract 投与マ

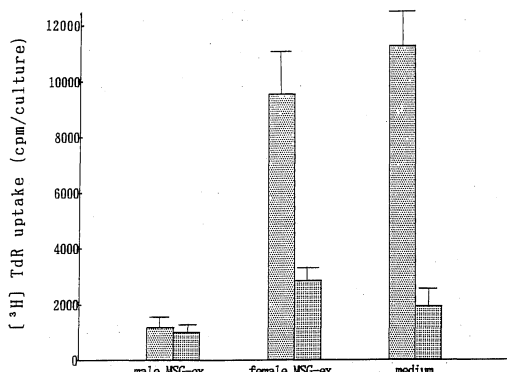


Fig. 2. Effect of the in-vivo treatment of MSG-extract on the mitogen-induced blastogenesis of splenocytes prepared from treated mice. \square ConA(+), \blacksquare ConA(-). Horizontal bar represents S.D.

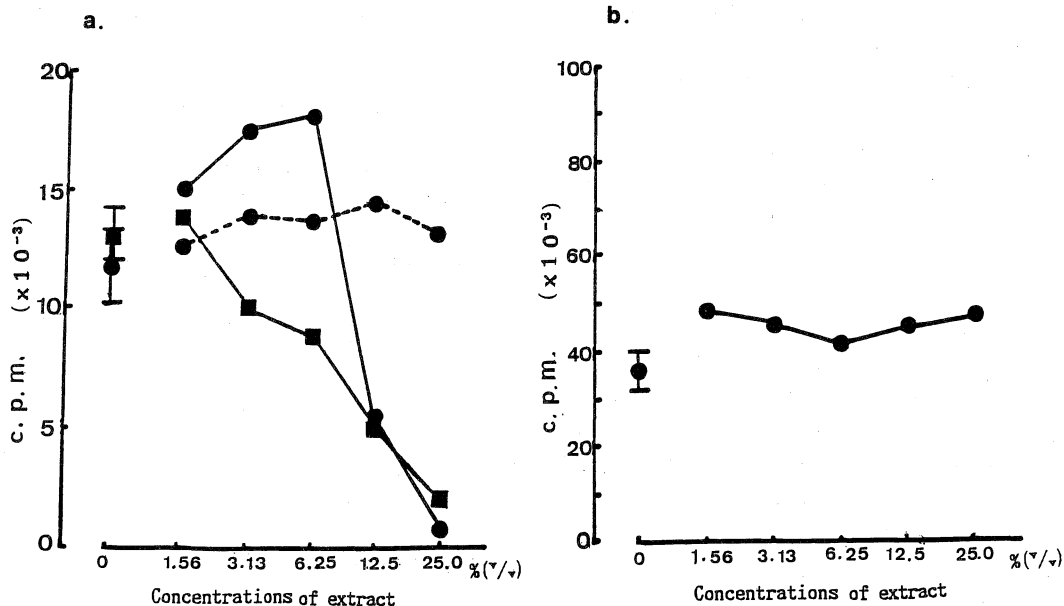


Fig. 3. Effect of various MSG-extract preparation on mitogen-induced blastogenesis of splenocytes. (●) ConA-induced and (■) LPS-induced responses. (—) native extract, (-----) extract absorbed with charcoal-dextran. a. MSG-extract of male mice. b. MSG-extract of female mice. (○) Mean control \pm S.D. in ConA response. (□) Mean control \pm S.D. in LPS response.

ウスの脾細胞は対照群と同程度の取り込みを示した。すなわち、雄の MSG-extract 投与マウスの脾細胞幼若化反応が抑制されていることが認められた (Fig. 2)。

2. MSG-extract および Kidney extract の脾細胞幼若化反応への影響

雄 MSG-extract を脾細胞の培養系に加え、ConA または LPS で刺激すると、いずれのマイトジェンで刺激した場合も 25.0 % MSG-extract では、90 % 以上、12.5 % MSG-extract では、50 % 以上、脾細胞幼若化反応が抑制された。しかし、チャコール・デキストランで吸収処理した後、雄の MSG-extract では抑制作用は、認められなかった (Fig. 3a)。雌の MSG-extract を ConA に対する脾細胞の反応系に加えると、いずれの濃度においても抑制作用は認められなかった (Fig. 3b)。雄、雌とも Kidney extract では、ConA に対する脾細胞の反応を抑制せず、むしろ雌の extract では、亢進作用を示した (Fig. 4)。

3. 雄 MSG-extract の腹腔マクロファージに対する作用

25.0 % の MSG-extract を加えて培養した、腹腔マクロファージの培養上清は、ConA に対する、脾細胞の反応を 76 % 抑制し、12.5 % MSG-extract では 39 % 抑制し

た (Fig. 5)。

4. 雄 MSG-extract の脾臓リンパ球に対する作用

高濃度の雄 MSG-extract は、マクロファージ非存在

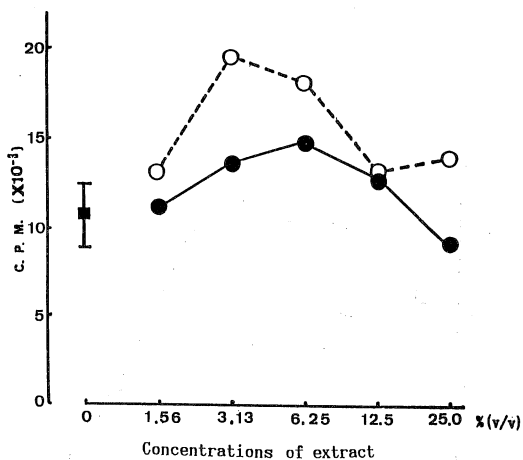


Fig. 4. Effect of kidney extract (male mice ●, female mice ○) on ConA-induced blastogenesis of splenocytes. (■) Mean control \pm S. D.

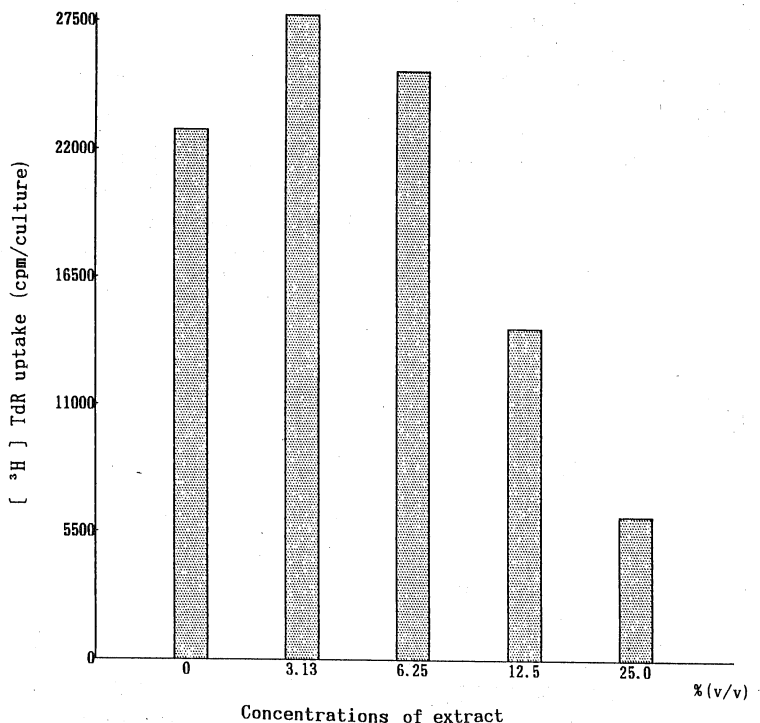


Fig. 5. Effect of the culture supernatants of macrophages treated with MSG-extract on the ConA-induced blastogenesis of splenocytes.

下でも、脾細胞の場合と同様に ConA に対する T-cell の反応、および、LPS に対する B-cell の反応を抑制した。すなわち、リンパ球に対して、直接的な抑制作用が認められた(Fig. 6)。

5. 雄 MSG-extract の IL 2 の作用に対する影響

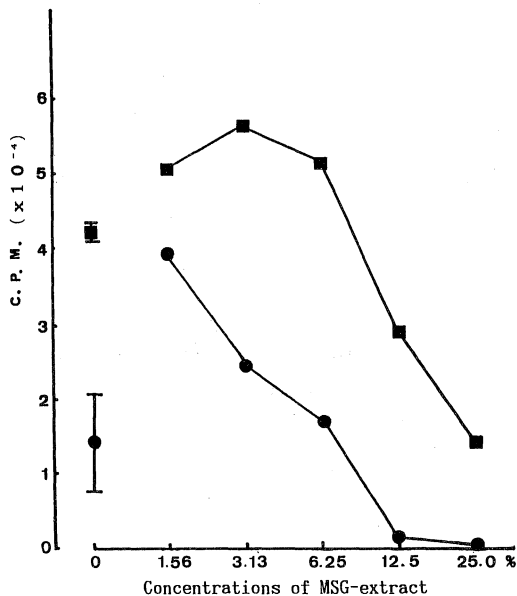


Fig. 6. Effect of MSG-extract on mitogen-induced blastogenesis of T or B cells. (●) conA-T cell, (■) LPS-B cell.
(○) Mean control \pm S.D. in ConA response.
(■) Mean control \pm S.D. in LPS response.

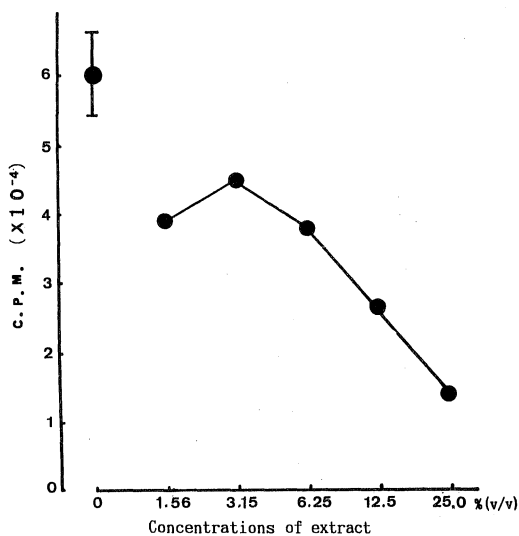


Fig. 7. Effect of MSG-extract on T-lymphoblastes responses to IL2. (●) Mean control \pm S.D.

雄 MSG-extract は、濃度依存的に、T-lymphoblast の IL 2 による増殖作用を抑制した(Fig. 7)。

6. 雄 MSG-extract で前処理した脾細胞の幼若化反応

48 時間雄 MSG-extract 存在下で培養した脾細胞は、洗浄することによって、非存在下で培養した脾細胞と、同程度の [3 H] thymidine の取り込み量を示した。すな

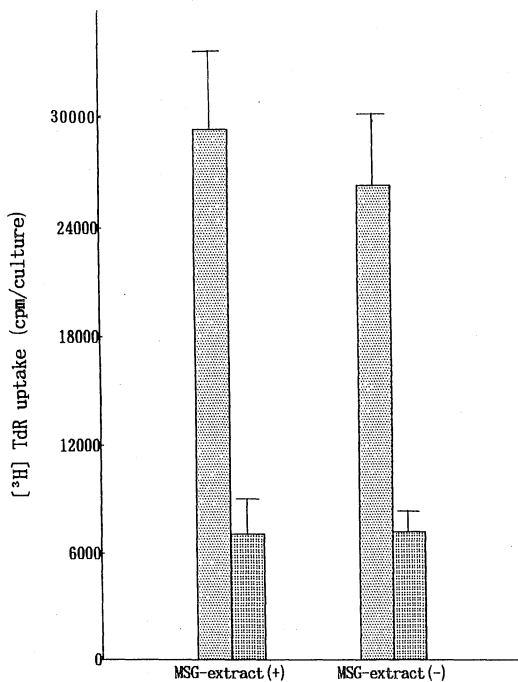


Fig. 8. Effect of a 48h-treatment of splenocytes with MSG-extract on the ConA-induced blastogenesis.
(▨) ConA(+), (■) ConA(-).
Horizontal bar represents S.D.

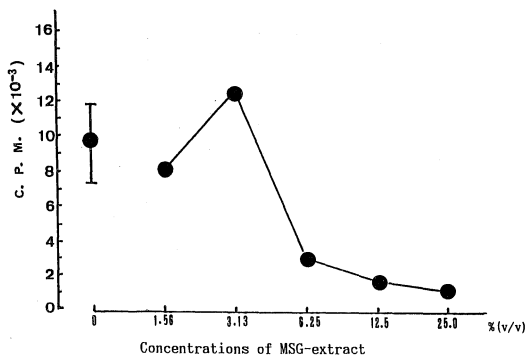


Fig. 9. Effect of MSG-extract on mixed lymphocyte reaction. (●) Mean control \pm S.D.

わち、培養液中の MSG-extract を除くことにより、脾細胞の反応性は回復した (Fig. 8)。

7. MSG-extract の MLR に対する作用

雄 MSG-extract は MLR に対しても、抑制作用を示し (Fig. 9) 25 % MSG-extract では 87 %, 6.25 % MSG-extract でも 70 % 抑制した。

8. 性ホルモン投与マウスにおける MSG-extract の脾細胞幼若化反応に対する作用

17- β -エストラジオール投与雄マウスの MSG-extract は、投与しなかった雄マウスの MSG-extract と同程度に、高濃度で、脾細胞幼若化反応を抑制し、エストラジオールによる、抑制活性の低下は認めなかった。テストステロン投与雌マウスの MSG-extract も、雄マウスの MSG-extract 同様の抑制作用を示した (Fig. 10)。

9. 雄 MSG-extract の熱処理による影響

雄 MSG-extract は、100°C、30 分の加熱処理でも抑制活性を失わず、加熱前と同程度に、ConA に対する脾細胞幼若化反応を抑制した (Fig. 11)。

10. 等電点電気泳動

MSG-extract 中には、リンパ球幼若化反応を亢進させる物質と、抑制する物質とが存在し (Fig. 12)、前者は等電点 (pI) 4.1 (Fraction NO. 4) pI 4.5 (Fraction NO. 6), pI 5.5 (Fraction NO. 9) であり、後者は、pI 7.4 (fraction NO. 15) であった。

考 察

本研究では、マウス顎下腺抽出液を作成し、免疫担当細胞中の、主として脾臓リンパ球に対する作用を解析し、性ホルモンとの関連について調べた。

雄 MSG-extract は、*in vivo* においても、*in vitro* においても、脾細胞のマイトジェンに対する幼若化反応を抑制した。*in vitro* では、雄、雌いずれの脾細胞に対しても抑制作用を示した。これは、既存の報告と一致するものであった。一方、雌 MSG-extract、あるいは顎下腺と同じくアンドロゲン・レセプターを有する腎臓の抽出液では、このような抑制作用が認められなかったことから、この作用は、雄マウス顎下腺に特異的であるといえる。顎下腺には多くのプロテアーゼが存在し、島村らは、このうちのセリンプロテアーゼである腺性カリクレインの細胞障害活性について報告している²³⁾。しかし、本研究では、MSG-extract を、100°C、30 分の加熱によっても抑制活性が消失しなかったことから、この抑制物質は、易熱性のプロテアーゼでないと考えられる。またこの物質は pronase 処理によってもせず失活せず、酸、アルカリに対しても比較的安定であった。MSG-extract のリ

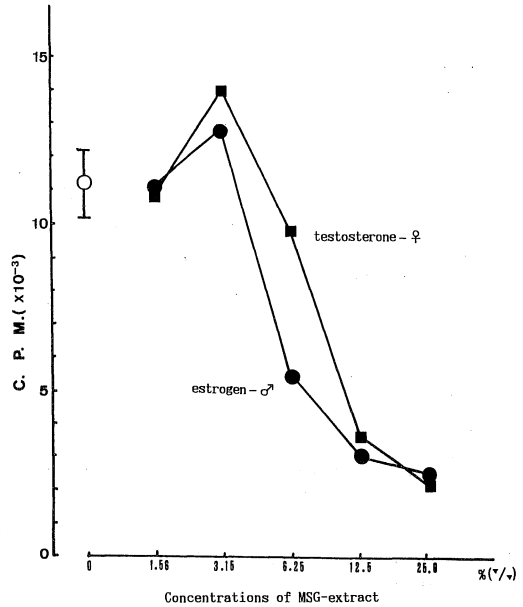


Fig. 10. Effect of MSG extracts derived from the estrogen-treated male mice (●) or testosterone-treated female mice (■) on ConA-induced blastogenesis of splenocytes. (○) Mean control \pm S.D.

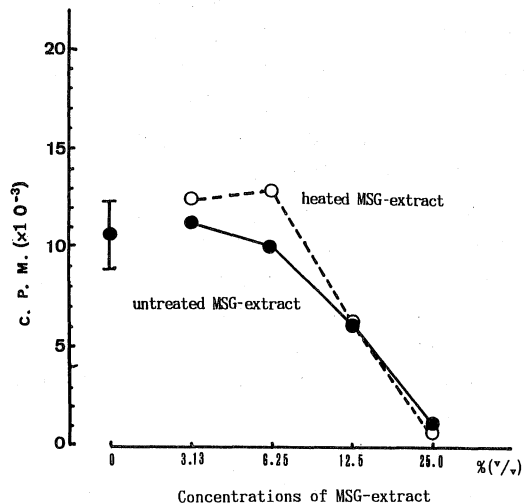


Fig. 11. ConA-induced blastogenesis of splenocytes in the presence of MSG-extract heated at 100°C for 30 min. (●) Mean control \pm S.D.

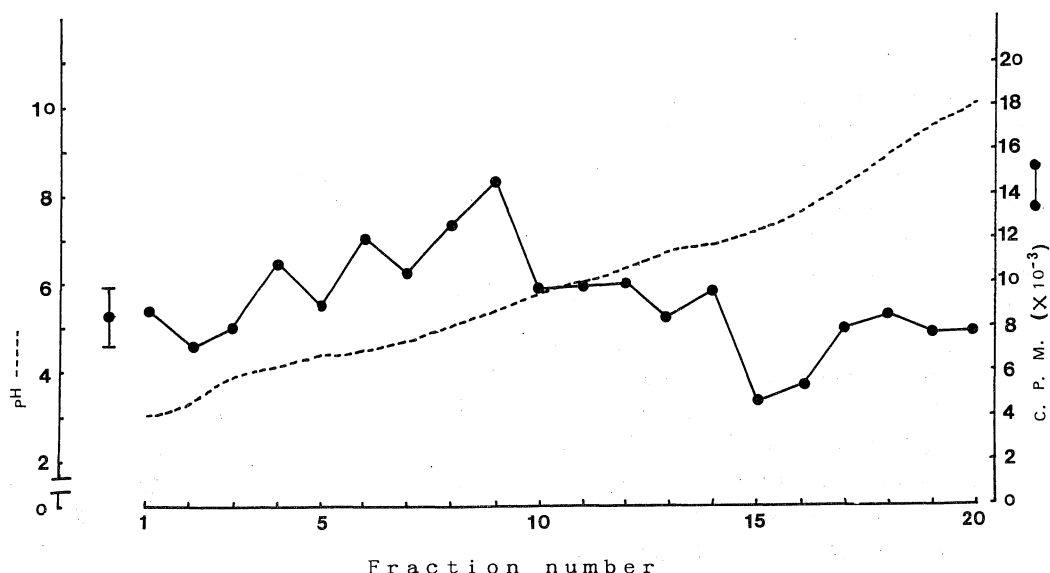


Fig. 12. Isoelectric focusing of MSG-extract. All fractions were tested for there ability to suppress the blastogenesis of ConA-stimulated splenocytes. (●) Mean control \pm S. D.

ンパ球幼若化反応抑制機構には、マクロファージを介した作用と、リンパ球に対する直接作用とが存在した。マクロファージに対する作用については、培養上清中に抑制物質が産生されるためには48時間MSG-extractとマクロファージのco-cultureが必要であったことから、単にマクロファージの細胞表面に付着した、MSG-extract中の抑制物質による作用ではないと思われる。MSG-extractで、48時間刺激を受けたマクロファージによって、新たに抑制物質が細胞外に産出された、と考えられる。このような抑制物質としては、Pierceらによって報告されているsoluble immune response suppresor(SIRS)がある²⁴⁾。SIRSはConA刺激によってLyt²⁺T-cellから産生させる免疫調整因子であり、リンパ球に直接作用するのみならず、マクロファージに作用して、second soluble factorを産生せしめ、この因子を介して抑制作用を発現する。MSG-extract中の抑制物質もマクロファージに対してsecond mediatorを産生させることがわかった。

一方、リンパ球に対しては、T-cell, B-cell, いずれのリンパ球のミトージンに対する反応にも、抑制作用を示した。しかし、この作用は可逆的であり、48時間MSG-extractで処理した後、細胞を洗浄することにより、増殖能が回復した。さらにMSG-extractで48時間培養したリンパ球はdye exclusion testによって細胞障害が起こっていないことが確認されたことから、リンパ

球に対する本物質の抑制作用は、直接的な細胞毒性ではないといえる。MLRに対しても抑制作用を示し、helper T-cellのアロ抗原に対する反応も抑制することがわかった。

IL 2に対するT-lymphoblastの反応については、本研究では、雄MSG-extractによって抑制されたが、Kempらの報告では、ラット顎下腺抽出液は、IL 2依存性細胞であるCTLL-2cellのIL 2による増殖の抑制は認められていない²⁵⁾。筆者は別の実験において、IL 2依存性細胞であるHT-2cellのIL 2に対する反応、ならびにミエローマ細胞では、雄MSG-extractが抑制作用を認めなかったことから、細胞のlife cycleによってMSG-extractに対する細胞の反応性が異なる可能性が示唆された。正常なリンパ球やT-lymphoblastでは、ミトージンで刺激してもMSG-extractが存在するとコンピテンス状態になることができないが、ミエローマ細胞やHT-2 cellのようにもともとコンピテンス状態にある細胞では、MSG-extractの有無に関わらずプログレッション因子さえ与えられれば、G₁期からS期へと移行していくと考えられる。さらにMSG-extractがc-fos, c-myc蛋白質の発現とどのように関わっているか調べる必要があろう。雄MSG-extractが、このような広範囲の細胞に対して、抑制作用を示したこと、テストステロン投与雌マウスのMSG-extractにも抑制活性が認められたこと、雄MSG-extractをチャコール・デキストランで

吸収処理すると、抑制作用が消失したことから、抑制物質はホルモン様物質である可能性がある。マウス顎下腺は性ホルモンの標的器官になっており、Junqueiraら(1949)は、去勢マウスの顎下腺のプロテアーゼ産生能が、テストステロン、エストラジオール、プロジェステロンのいずれの投与によっても亢進し、中でも、テストステロンが最も著しいと報告している²⁶⁾。また、Angelettiら(1967)は、テストステロン投与により、顎下腺の estero-proteolytic activity が亢進すると報告し²⁾。Oliverら(1967)は、去勢マウスではレニン様物質の活性が低下するが、去勢マウスおよび雌マウスにテストステロンを投与することにより、活性は回復すると報告している¹⁾。本研究において、雄マウスおよびテストステロン投与雌マウスの MSG-extract にリンパ球に対する抑制作用が認められたこと、エストロゲン投与雄マウスの MSG-extract にも抑制活性が認められたことは、これらの報告と共通する。抑制物質の本体については、顎下腺で集積されたテストステロンが直接作用していることも考えられるが、雄 MSG-extract 中のテストステロン量をラジオイムノアッセイで測定した結果、5 ng/dl 以下であり、このような低濃度のテストステロン濃度では、脾細胞幼若化反応の抑制はみられなかった。また、別の実験で3週令の雄マウス MSG-extract は、抑制作用が認められたものの8週令の雄マウスに比べて組織重量あたり活性物質量は少なく、一方、12カ月令マウスの MSG-extract では8週令の雄マウスと同等の抑制活性が認められた。アンドロゲン不応答性である testicular feminization syndrome mouse (Tfm mouse)²⁷⁾の雄の MSG-extract においても抑制作用は弱かった。これらのことから、テストステロンが直接作用しているのではなく、むしろ、テストステロンによって、抑制物質の産生が誘導されるようになったと考えられる。テストステロンは、免疫調節機能を有し、胸腺の萎縮、骨髄リンパ球の減少、あるいは suppressor T-cell の活性化により、抑制的に作用することが知られている²⁸⁾²⁹⁾。このため、雄は雌に比べて易感染性であり、逆に雌は自己免疫疾患に罹患しやすいことが言われてきた。本研究で、マウスではテストステロンが直接的に、免疫系細胞に作用するのみならず、顎下腺を介しても、抑制作用を示すことが示唆された。また顎下腺の EGF 産生もテストステロンの影響を受け³⁰⁾³¹⁾、EGF 自体に DNA, RNA, 蛋白質合成を亢進させる作用のあることが知られており¹⁰⁾¹¹⁾、実際に雄マウス顎下腺が、直接テストステロンによって免疫抑制物質を産生するのか、EGF のような増殖因子によって誘導されるのかは現在不明である。しかし、雄マウス顎下腺が

NGF, EGF 等の創傷治癒を促進する因子を分泌する一方で免疫抑制物質を産生し、いずれもテストステロンに支配されていることが認められた。

結 語

MSG-extract の脾細胞に対する作用を解析し、性ホルモンとの関連を調べ、以下の結果が得られた。

1. 雄 MSG-extract は、*in vivo* でも *in vitro* でも脾細胞幼若化反応に対して、抑制作用を示した。
2. リンパ球に対する作用には、マクロファージを介した作用と、リンパ球への直接作用とが存在した。
3. 雄 MSG-extract がリンパ球に対する作用は可逆的であった。
4. MSG-extract 中の抑制物質の産生は、テストステロンによって誘導され、エストラジオールで拮抗されなかった。
5. MSG-extract 中の作用物質は熱に対し抵抗性であり等電点(pI)は7.4であった。

(稿を終えるにあたり、始終御懇篤なるご指導、ご校閲を賜った細菌学教室榎葉周三教授、ならびに喜多英二講師に深謝を捧げるとともに、細菌学教室の諸兄に感謝の意を表します。

なお、本論文の要旨は、第20回日本免疫学会総会(東京)、第46回日本細菌学会総会(大阪)において発表した。)

文 献

- 1) Oliver, W. J. and Grose, F. : Am. J. Physiol. 213 (2) : 341, 1967.
- 2) Angeletti, R. A., Angeletti, P. U. and Calissano, P. : Biochim. Biophys. Acta 139 : 372, 1967.
- 3) Verhoeven, G. and Wilson, J. D. : Endocrinology 99 : 79, 1976.
- 4) 太田 稔 : Jpn. J. Oral. Biol. 27 : 1007, 1985.
- 5) 小鹿真理, 榎井まゆみ, 頼近 龍, 中山義之 : Jpn. J. Oral. Biol. 29 : 633, 1987.
- 6) Cohen, S. : J. Biol. Chem. 237 : 1555, 1962.
- 7) Cohen, S. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 46 : 302, 1960.
- 8) Caramia, F., Angeletti, P. U. and Montalcini, R. L. : Endocrinology 70 : 915, 1962.
- 9) Cohen, S. : J. Invest. Dermatol. 59 : 13, 1972.
- 10) Carpenter, G. : Ann. Rev. Biochem. 48 : 193, 1979.

- 11) **Cohen, S.** : In Vitro Cellular and Developmental Biology 23(4) : 239, 1987.
- 12) **Barka, T.** : J. Histochem. Cytochem. 28(8) : 836, 1980.
- 13) **細井和雄, 上羽隆夫** : Jpn. J. Oral. Biol. 24 : 1, 1982.
- 14) **Takeda, T., Yamasaki, H., Yamabe, H., Suzuki, Y., Haebara, H., Irino, T. and Grollman, A.** : Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 126 : 212, 1967.
- 15) **Takeda, T. and Grollman, A.** : Am. J. Physiol. 215 : 1337, 1968.
- 16) **Kongshaven, P. A. L. and Bliss, J. Q.** : Immunology 19 : 363, 1970.
- 17) **Hiramatsu, M., Hatakeyama, K., Hosoi, K. and Minami, N.** : Immunology 37 : 869, 1979.
- 18) **Julius, M. H., Simposon, E. and Herzenberg, L. A.** : Eur. J. Immunol. 3 : 645, 1973.
- 19) **Peck, A. B. and Back, F. H.** : J. Immunol. Methods 3 : 147, 1973.
- 20) **Kemp, A., Mellow, L. and Sabbadini, E.** : Immunology 56 : 261, 1985.
- 21) **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.** : J. Biol. Chem. 193 : 265, 1951.
- 22) **Bradford, M. M.** : Anal. Biochem. 72 : 248, 1976.
- 23) **Shimamura, T., Nagumo, N., Ikigai, H., Murakami, K., Okubo, S., Toda, M., Onishi, R. and Tomita, M.** : Immunology Letters 22 : 155, 1989.
- 24) **Pierce, C. W., Johnson, B. M., Gershon, H. E. and Asofsky, R.** : J. Exp. Med. 134 : 395, 1971.
- 25) **Kemp, A., Mellow, L. and Sabbadini, E.** : J. Immunol. 137 : 2245, 1986.
- 26) **Junqueira, L. C., Fajer, A., Rabinovitch, M. and Frankenthal, L.** : J. Cell. & Comp. Physiol. 34 : 129, 1949.
- 27) **Lyon, M. F. and Hawkes, S. G.** : Nature 227 : 1217, 1970.
- 28) **Cohn, D. A.** : Arthritis and Rheumatism 22 (11) : 1218, 1979.
- 29) **Ahmed, A. S., Dauphinee, J. M. and Talal, N.** : J. Immunol. 134(1) : 204, 1985.
- 30) **Byyny, R. L., Orth, D. N. and Cohen, S.** : Endocrinology 90 : 1261, 1972.
- 31) **Bullock, L. P., Barthe, P. L., Mowszowicz, I., Orth, D. N. and Bardin, C. W.** : Endocrinology 97 : 189, 1975.